

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA PARAÍBA
CAMPUS SOUSA
BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Juliany Alves de Souza

AVALIAÇÃO DE TECIDO OVARIANO BOVINO EXPOSTO AO FATOR DE
CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF) SEGUIDO DE
AUTOTRANSPLANTE SUBCUTÂNEO: RESULTADOS PRELIMINARES

SOUSA – PB

2021

Juliany Alves de Souza

AValiação DE Tecido Ovariano Bovino Exposto AO Fator DE
CREscimento Endotelial Vascular (VEGF) Seguido DE
Autotransplante Subcutâneo: Resultados Preliminares

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado,
como parte das exigências para a conclusão do
Curso de Graduação de Bacharelado em
Medicina Veterinária do Instituto Federal da
Paraíba, Campus Sousa.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Léo Nascimento de Aguiar

SOUSA – PB

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Leandro da Silva Carvalho – Bibliotecário CRB 15/875

Souza, Juliany Alves de

S729a Avaliação de tecido ovariano bovino exposto ao fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) seguido de autotransplante subcutâneo: resultados preliminares / Juliany Alves de Souza. - Sousa, 2021.
39 p.: il.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Léo Nascimento de Aguiar.
TCC (Graduação – Bacharelado em Medicina Veterinária) - IFPB, 2021.

1. Angiogênese. 2. Fatores de crescimento. 3. Folículos pré-antrais.
4. Hipóxia. 5. Transplante. I. Aguiar, Francisco Léo Nascimento de.
II. Título.

IFPB Sousa / BS

CDU 619



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA INSTITUTO
FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA PARAÍBA
CAMPUS SOUSA

CERTIFICADO

APROVAÇÃO

Título: “AVALIAÇÃO DE TECIDO OVARIANO BOVINO EXPOSTO AO FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF) SEGUIDO DE AUTOTRANSPLANTE EM SÍTIO SUBCUTÂNEO: RESULTADOS PRELIMINARES”.
Autora: Juliany Alves de Souza. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba, Campus Sousa como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Aprovado pela Comissão Examinadora em: 21/ 05/ 2021.

(assinado eletronicamente)

Professor Doutor Francisco Léo Nascimento de Aguiar
IFPB - Campus Sousa
Professor Orientador

(assinado eletronicamente)

Professora Doutora Patricy de Andrade Sales
IFPB – Campus Sousa
Examinadora 1

(assinado eletronicamente)

Professora Doutora Franciele Osmarini Lunardi
Instituto Federal do Amazonas - IFAM
Examinadora 2

Documento assinado eletronicamente por:

- **Franielo Osmarini Lunardi**, PROFESSOR DE ENSINO SUPERIOR NA ÁREA DE ORENTAÇÃO EDUCACIONAL, em 01/07/2021 20:59:31.
- **Patricy de Andrade Salles**, PROFESSOR ENS BASICO TECNTECNOLOGICO, em 15/06/2021 07:36:30.
- **Francisco Léio Nascimento de Aguiar**, PROFESSOR ENS BÁSICO TECN TECNOLÓGICO, em 14/06/2021 21:23:03.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 14/06/2021. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifpb.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 197088

Código de Autenticação: 939150ec17



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus,
por ser meu guia e peça fundamental em
minha vida, e a minha família que sempre foi
minha fortaleza, fonte de apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela dádiva e o dom da vida, por sempre me abençoar, por ser meu guia em todos os momentos, por sempre me proteger, por me dar forças e me manter firme na fé.

Aos meus pais Francisco (Tota) e Francisca (Deda) por todo apoio, todo amor, dedicação, por terem sonhado junto comigo, por sempre acreditarem em mim e não me deixarem desanimar mesmo nos dias mais difíceis. Sou grata a vocês por tudo, tudo que faço e sou é por vocês e para vocês.

Aos meus irmãos Giliany e Gilliard que são parte de mim, por todo amor, carinho, compreensão, incentivo e companheirismo. E por terem me dado os melhores presentes, meus sobrinhos Francisco Neto, José Gabriel e Ana Liz, eles que me arrancam os melhores sorrisos e os mais sinceros sentimentos.

Ao meu cunhado Wellington e minha cunhada Luana por todo apoio incondicional.

Agradeço a Deus por ter essa família maravilhosa, minha fortaleza, fonte de inspiração, o que me manteve e me mantém firme e forte na minha caminhada em busca dos meus sonhos.

A todos os meus outros familiares que sempre me apoiaram, acreditaram em mim e me deram forças, meu muito obrigada!

A meu amigo Robério (*in memoriam*) Deus o levou para morar ao seu lado antes da minha aprovação na faculdade, mas, sei que me abençoou aí de cima.

Ao meu orientador Prof. Francisco Léo Nascimento de Aguiar, por me dar a oportunidade de desenvolver este trabalho sob sua orientação, por toda credibilidade depositada em mim, por ter acreditado na minha capacidade, por todo conhecimento transmitido, por toda disponibilidade e ajuda e por toda compreensão e incentivo.

A banca examinadora Prof^ª Patricy de Andrade Salles, ela que é minha professora e sempre me apoiou e a Prof^ª Dra. Franciele Osmarini Lunardi pela disponibilidade e sem sombra de dúvidas, obrigada pelas contribuições.

Aos companheiros de convivência Naianne e Delano, vocês foram peças fundamentais em minha vida, obrigada por todo carinho e apoio.

À Kiára minha amiga e irmã de coração que a veterinária me deu, ela que sempre esteve comigo nesses anos de graduação, sempre me acolheu e me deu todo amor e carinho. Sou eternamente grata a você por tudo!

Aos meus colegas de turma (Mariana, Paula, Hodias, Bruno, Felipe, Carol, Kiára, Andressa, Edvaldo, Marielly, Magnun) pela felicidade de ter dividido tantos momentos bons durante todos

esses anos de curso, a caminhada foi árdua, mas, obrigada pelas conversas, risadas, brigas, troca de conhecimento. A amizade e o companheirismo de vocês tornaram a jornada mais leve.

A todos meus colegas e amigos que conquistei dentro do IFPB.

A todos os meus professores, aos quais tenho um imenso carinho e respeito. Eles que foram e são peças fundamentais para a minha formação, obrigada por todo conhecimento repassado.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba (IFPB) – Campus Sousa, do qual sentirei muita saudade, lembrarei eternamente dos bons momentos vividos e de todo aprendizado.

A todas as pessoas que fazem parte do IFPB, obrigada por tudo, pelo acolhimento, carinho e apoio.

Aos meus amigos de Sousa, pelos quais tenho um enorme carinho.

A Universidade Estadual do Ceará (UECE), pela oportunidade de poder desenvolver este projeto tão especial e importante para minha vida e carreira profissional.

Ao Prof. Dr. Eduardo Leite Gastal pela confiança e por todo apoio. A Profª Dra. Samara Souza por todo apoio e disponibilidade. A Mestre e futura Doutora Ana Normélia, ela que não mediu esforços para me ajudar nas análises, obrigada por todo apoio e incentivo.

Ao Laboratório de Diagnóstico por Imagem Aplicado a Reprodução (LADIAR) da UECE em nome de Fabiana Brandão e do professor Dárcio Ítalo Teixeira por ter cedido o espaço para que eu pudesse fazer as leituras das lâminas e ao Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-antrais (LAMOFOPA), por todo o auxílio no processamento histológico do material obtido. A Raellyca e Amanda que me acolheram durante a minha estadia em Fortaleza, levarei vocês sempre em meu coração.

Ao Laboratório de Parasitologia do IFPB em nome do Prof. Vinicius que me cedeu o espaço para que eu pudesse fazer as fotos do meu trabalho.

A todos os animais, principalmente os que contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos, que mesmo distantes torcem por mim e pelo meu sucesso.

Enfim, meu muito obrigada a todas as pessoas, mesmo as que não foram aqui mencionadas, mas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste sonho.

RESUMO: O transplante de tecido ovariano (TTO) é uma biotécnica utilizada com sucesso para a preservação da fertilidade em humanos. Contudo, os atuais protocolos realizados precisam ser aprimorados. Devido restrições éticas em experimentação com material biológico humano, modelos animais são alternativas comparativas eficientes. Assim, visando a otimização desta biotécnica, diversos fatores vêm sendo testados, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Este trabalho objetivou avaliar a eficiência da exposição prévia ao VEGF sobre o tecido ovariano bovino seguido de autotransplante subcutâneo por sete dias. Foram utilizadas três vacas, estas foram biopsiadas para a coleta de fragmentos ovarianos (n = 18), estes foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos: (1) Controle fresco (n = 6), fragmentos imediatamente fixados; (2) Transplante/VEGF+ (n = 6) e (3) Transplante/VEGF- (n = 6). Foram avaliados os seguintes pontos: fluxo sanguíneo na região do transplante por ultrassonografia Doppler, aspectos macroscópicos dos transplantes, número e morfologia dos folículos pré-antrais inclusos no tecido autotransplantado e os diferentes estádios de desenvolvimento folicular. Não foi observado diferença ($P > 0,05$) na avaliação da perfusão sanguínea entre tratamentos transplantados; na avaliação macroscópica; quanto a média de folículos em desenvolvimento; e quanto ao percentual de folículos normais quando comparando o grupo controle com o os grupos tratamento. No entanto houve uma diferença ($P < 0,05$) quando comparado a percentagem de folículos normais entre os grupos transplantados, onde o grupo VEGF – foi significativamente superior. Como conclusão, os resultados preliminares demonstraram resultados similares para a sobrevivência do tecido transplantado após exposição ou não com VEGF.

Palavras-chave: Angiogênese. Fatores de crescimento. Folículos pré-antrais. Hipóxia. Transplante.

ABSTRACT: Ovarian tissue transplantation (OTT) is biotechnology used with success to preserve fertility in humans. However, the current protocols performed should be improved. Due to ethics restrictions in the experimentation with human biological material, comparative animal models have been alternatively used with efficiency. Hence, aiming at the optimization of this biotechnology, several factors have been tested as the vascular endothelial growth factor (VEGF). This study aimed to evaluate the efficiency of the previous exposure to VEGF in the bovine ovarian tissue followed by subcutaneous autotransplantation for seven days. Three mares were used and biopsied to the harvesting of ovarian fragments (n = 18), and were distributed randomly in the following groups: (1) Fresh control (n = 6) fragments immediately fixed; (2) Transplantation/VEGF+ (n = 6) and (3) Transplantation/VEGF- (n = 6). The following endpoints were evaluated: blood flows in the transplantation region using Doppler ultrasonography, macroscopic aspects of the grafts, number, and morphology of the preantral follicles enclosed in the autotransplanted tissue, and the different follicular development stages. No difference ($P > 0.05$) was observed between the transplanted treatments considering blood perfusion, macroscopic evaluation, mean follicular development, and the percentage of normal follicles when comparing the fresh control group and the transplanted groups. However, a difference ($P < 0.05$) when compared with the percentage of normal follicles between the transplanted groups, with the Transplantation/VEGF- group being significantly superior. As a conclusion, the preliminary results demonstrated similarities for the survivability of the transplanted tissue after tissue exposure or not to VEGF.

Keywords: Angiogenesis. Growth factors. Hypoxia. Preantral follicles. Transplantation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Classificação dos folículos ovarianos pré-antrais e antrais quanto ao estágio de desenvolvimento.	18
Figura 2 – Imagem ilustrativa dos tipos de transplante de tecido ovariano de acordo com o indivíduo doador e o indivíduo receptor do enxerto.	19
Figura 3 – Imagem ilustrativa dos tipos de transplante de tecido ovariano bovino de acordo com o local onde é realizado o enxerto.	20
Figura 4 – Desenho experimental.	25
Figura 5 – Área de fluxo sanguíneo (em pixels) das regiões em cada sítio de transplante heterotópico (R5, VEGF+ e R6, VEGF-) em fragmentos expostos (+) ou não (-) ao fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) ao longo dos dias pós-transplante.	28
Figura 6 – Imagens morfológicas de folículos pré-antrais de tecido ovariano bovino autotransplantado subcutâneamente.	31
Figura 7 – Percentual (%) de folículos pré-antrais morfológicamente normais após autotransplante heterotópico de tecido ovariano bovino.	32
Figura 8 – Média (\pm erro padrão da média, EPM) do desenvolvimento folicular de folículos morfológicamente normais após autotransplante heterotópico de tecido ovariano bovino.	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sistema semiquantitativo para a classificação macroscópica dos fragmentos ovarianos após autotransplante subcutâneo.	26
Tabela 2 – Valores médios (X), desvio padrão (s), erro padrão da média (EPM) e variância (V) da avaliação macroscópica de fragmentos ovarianos bovino com e sem VEGF, após autotransplante subcutâneo por sete dias.	29
Tabela 3 – Distribuição do número de folículos pré-antrais normais e anormais por categoria folicular entre os animais e entre os tratamentos.	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
~	Aproximadamente
±	Mais ou Menos
®	Marca Registrada
μ	Micrometro
μM	Micromolar
ADSCs	Adipose Derived Stem Cells (Células-Tronco Derivadas de Tecido Adiposo)
bFGF	Fator Básico de Crescimento de Fibroblastos
BPU	Biopsy Pick-Up
BSA	Bovine Serum Albumin (Albumina Sérica Bovina)
cm	Centímetro
EPM	Erro Padrão da Média
HEPES	4-(2-hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic acid)
IFAM	Instituto Federal de Ciência, Educação e Tecnologia do Amazonas
IFPB	Instituto Federal de Ciência, Educação e Tecnologia da Paraíba
IM	Intramuscular
IV	Intravenosa
Kg	Quilograma
L	Litro
LADIAR	Laboratório de Diagnóstico por Imagem Aplicado a Reprodução
LAMOFOPA	Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-antrais
mg	Miligrama
MHz	Mega-Hertz
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
ng	Nanograma
°C	Graus Celcius
P<0,05	Probabilidade de erro menor do que 5%
P>0,05	Probabilidade de erro padrão maior que 5%
PAS	Ácido Periódico-Schiff

R1	Região 1
R2	Região 2
R3	Região 3
R4	Região 4
R5	Região 5
R6	Região 6
SC	Subcutânea
TTO	Transplante de Tecido Ovariano
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (Fator de Crescimento Endotelial
α -MEM [±]	Alpha Minimal Essential Medium (Meio Essencial Mínimo Alfa Modificado)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1. Morfofisiologia ovariana bovina	17
2.2. Transplante de tecido ovariano	18
2.3. Isquemia, hipóxia e angiogênese	20
2.4. Aditivos para melhorar a sobrevivência do tecido ovariano no enxerto	21
2.4.1. VEGF no transplante de tecido ovariano.....	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1. Comitê de Ética	23
3.2. Animais	23
3.3. Coleta de tecido ovariano	23
3.4. Manuseio do tecido ovariano	24
3.5. Design experimental	24
3.6. Autotransplante de fragmentos ovarianos	24
3.7. Avaliação da perfusão sanguínea	25
3.8. Recuperação dos enxertos e avaliação macroscópica	26
3.9. Preparação do material para a avaliação histológica	26
3.10. Avaliação histológica	27
3.11. Análise estatística	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1. Avaliação da área de fluxo sanguíneo	28
4.2. Avaliação macroscópica	28
4.3. Avaliação dos cortes histológicos	29
4.3.1. Folículos morfolologicamente normais.....	31
4.3.2. Folículos em desenvolvimento.....	33
5. CONCLUSÃO	35
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

1. INTRODUÇÃO

O tratamento à base de quimioterápicos, em pacientes acometidas por câncer, produz como efeito colateral, uma intensa depleção da população de folículos ovarianos, culminando com perda da capacidade reprodutiva (OKTAY et al., 2016). Com o aumento nas últimas décadas da eficácia terapêutica das quimioterapias antineoplásicas, a manutenção da fertilidade e das funções endócrinas dessas pacientes pós cura têm sido uma preocupação de profissionais oncoelogistas e de pesquisadores no campo da reprodução.

Dentre as estratégias atualmente empregadas, o transplante de tecido ovariano (TTO) emerge como uma biotécnica promissora para garantir que a fertilidade e a atividade endócrina sejam preservadas, evitando-se o uso de terapias hormonais exócrinas (as quais sabidamente podem, ao longo do tempo, perder sua eficiência). Porém, a biotécnica de TTO necessita de aprimoramentos, uma vez que ainda há alguns empecilhos que diminuem sua eficácia.

Segundo Donfack (2017), a hipóxia tecidual e a isquemia são os principais obstáculos a serem superados logo após o transplante. A hipóxia é causada pela pobre vascularização tecidual pós enxertia e pela falta de tecido conjuntivo de sustentação entre o enxerto e o tecido circundado, acarretando em morte celular e conseqüente redução da qualidade do tecido transplantado. Sendo assim, a redução do período de isquemia/reperfusão tecidual pode potencializar o sucesso do transplante, tendo em vista que a angiogênese é um fator de suma importância para a sobrevivência do enxerto, capaz de mitigar a hipóxia tecidual após TTO.

Adicionalmente, no intuito de maximizar a sobrevivência durante o TTO, diversas substâncias vêm sendo investigadas. Uma delas é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que vem sendo utilizado como fator de sobrevivência em técnicas de TTO por possuir propriedades angiogênicas (SOUZA et al., 2020). Contudo, até o momento da execução deste trabalho, não existem estudos avaliando o efeito do VEGF em autotransplante de tecido ovariano bovino subcutâneo.

O uso de ovários humanos para manipulação e realização de transplantes para pesquisas é extremamente limitado, principalmente devido a sua escassez e as suas restrições éticas. Dessa forma o uso de animais como modelo experimental ganha importância ainda mais significativa. O modelo bovino tem sido empregado em TTO por possuir algumas semelhanças com os humanos, por exemplo: o tamanho do ovário, o diâmetro dos folículos maduros e corpo lúteo, a população folicular na região cortical, além de serem espécies monovulatórias e policíclicas; por ter bons resultados, inclusive com a produção de embriões (CAMPUS-JÚNIOR, 2016) e

por ser uma espécie de importante significado socioeconômico, uma vez que possui aptidões para a produção de carne, leite e pele.

Objetivou-se com este estudo, avaliar o efeito do VEGF sobre o tecido ovariano bovino autotransplantado em sítio subcutâneo, tendo a possibilidade de encontrar uma solução alternativa viável para maximizar os resultados obtidos em procedimentos de autotransplante, favorecendo a manutenção e restauração da fertilidade do córtex ovariano em mamíferos de produção com alto valor biológico e/ou espécies ameaçadas de extinção, bem como em humanos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Morfofisiologia ovariana bovina

O ovário é composto por diversos tipos de células diferenciadas que tem como principais funções a produção de hormônios, peptídeos e fatores de crescimento (endócrina) e a diferenciação e liberação de oócitos (gametogênica). Na maioria das fêmeas mamíferas, com exceção para a égua, a organização ovariana é dividida em uma porção cortical, localizado mais externamente, onde encontramos os folículos ovarianos em diversos estágios de desenvolvimento e uma porção medular, localizada internamente, constituída por tecido fibroelástico distribuído irregularmente, nervos e vasos sanguíneos (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

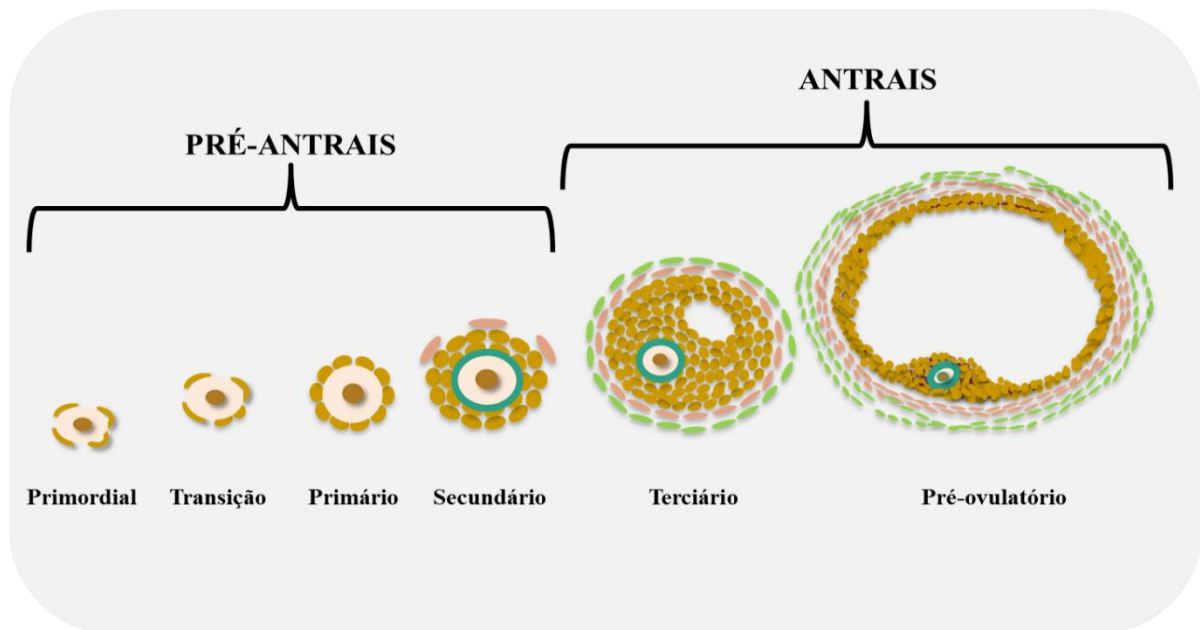
Dentro do ovário, os oócitos estão inclusos em folículos, que representam a unidade morfofuncional do ovário. Cada folículo é constituído por um oócito circundado por células da granulosa e da teca (DOS SANTOS et al., 2012). O crescimento e o desenvolvimento folicular, em bovinos, iniciam-se ainda durante a fase fetal, por volta dos 30 - 90 dias de gestação, quando ocorre o desenvolvimento das oogônias, com conseqüente formação dos folículos primordiais (WANDJI et al., 1996). Segundo Hulshof et al. (1994) os folículos primordiais são formados por um oócito, circundado por células da granulosa de formato pavimentoso e por células da teca. Estes representam cerca de 95% da população de folículos pré-antrais (PAFs) compreendidos pelos folículos que não possuem a formação de uma cavidade repleta de fluido folicular denominada de antro folicular (ERICKSON, 1986), permanecendo em estado de quiescência, caracterizado pela parada da proliferação das células da granulosa (ARAÚJO et al., 2014).

Após gradual recrutamento os folículos primordiais saem do estágio de dormência e passam para a fase de crescimento, iniciando o desenvolvimento folicular com retomada da proliferação das células da granulosa e a diferenciação morfológica destas, que mudam do formato pavimento para o formato cuboidal. Este fenômeno é conhecido como ativação folicular (SUH et al., 2002).

Uma vez ativados, os folículos são recrutados para o desenvolvimento e maturação folicular formando as demais categorias de PAFs: transição (oócito circundado por células da granulosa de formato pavimentoso e cubóide), primário (oócito, circundado por uma camada simples de células da granulosa de formato cuboidal) e secundário (oócito circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa de formato cuboidal, sem antro visível) (**Figura 1**). À medida que vai ocorrendo o crescimento dos folículos e a organização das células da granulosa

em várias camadas, dá-se o início da formação do antro, sendo classificados como folículos antrais, aqueles que possuem a cavidade antral repleta de líquido, divididos em: terciários e folículos pré-ovulatórios (ou de Graaf) (HULSHOF et al., 1994).

Figura 1 – Classificação dos folículos ovarianos pré-antrais e antrais quanto ao estágio de desenvolvimento.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Contudo, ao longo da vida reprodutiva apenas uma pequena fração dessa população folicular (aproximadamente 0,1%) sofre maturação e ovulação bem-sucedidas, a outra parte (99,9 %) é eliminada pelo processo fisiológico conhecido como atresia folicular, diminuindo assim o potencial reprodutivo da fêmea (NUTTINCK et al., 1993).

Quanto à manutenção da integridade morfológica, os folículos podem ser considerados como normais (contém um oócito intacto e células da granulosa intactas) e anormais ou degenerados (retração plasmática, picnose nuclear e desagregação entre células da granulosa e oócito, com desorganização da arquitetura folicular), (CARVALHO et al., 2014).

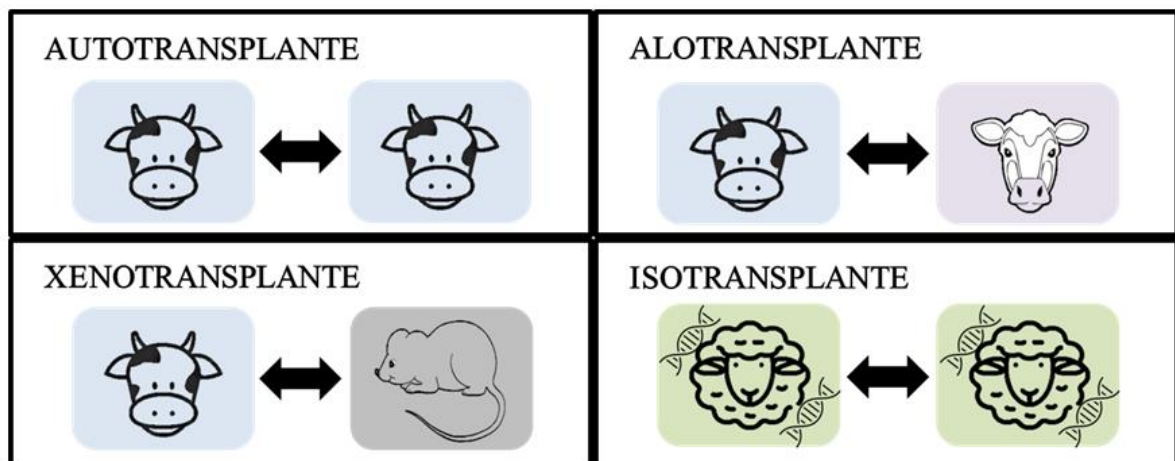
2.2. Transplante de tecido ovariano

Conforme Tahaei et al. (2015), o transplante ovariano pode ser estabelecido como um processo cirúrgico de reintrodução/introdução de tecidos ovarianos em hospedeiros vivos, que funcionam como incubadoras biológicas, estimulando a retomada da foliculogênese. Tendo

como objetivo principal a restauração da função endócrina e ovariana de mulheres que são submetidas a tratamento de câncer. A realização deste procedimento possibilita que as pacientes pré-púberes, ou não, iniciem rapidamente o seu tratamento contra a doença oncológica e em contrapartida tenha sua fertilidade assegurada (DONFACK, 2017).

De acordo com o indivíduo doador e o indivíduo receptor do enxerto, o transplante pode ser classificado como: a) alotransplante, ou seja, o transplante é realizado entre indivíduos de uma mesma espécie; b) autotransplante, o transplante é realizado no mesmo indivíduo; c) xenotransplante, realizado entre indivíduos de espécies diferentes e d) isotransplante, quando o transplante é realizado entre indivíduos geneticamente idênticos (DONFACK, 2017; SILBER et al., 2012) (**Figura 2**).

Figura 2 – Imagem ilustrativa dos tipos de transplante de tecido ovariano de acordo com o indivíduo doador e o indivíduo receptor do enxerto.



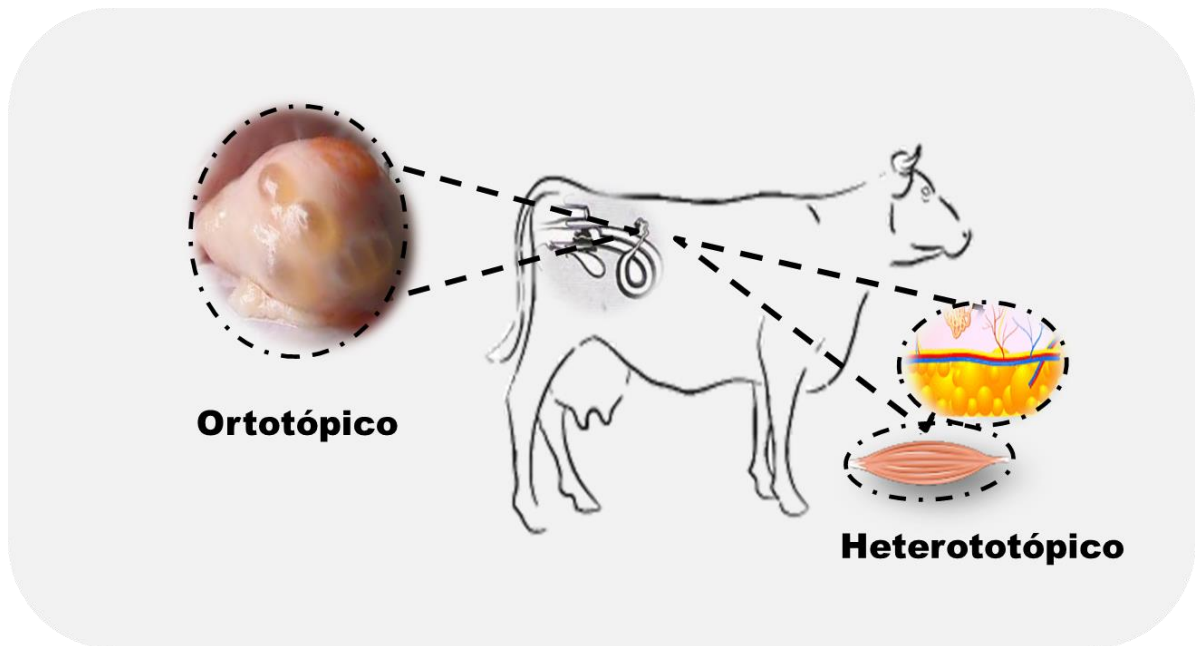
Fonte: Elaborada pelo autor.

Quanto ao local onde o tecido ovariano é enxertado, o transplante pode ser classificado como: a) ortotópico: o enxerto será realizado na cavidade pélvica, no ovário remanescente ou próximo a ele e b) heterotópico: o enxerto é feito fora da cavidade peritoneal, como por exemplo, nos sítios intramuscular (IM) e subcutâneo (SC) (DONNEZ et al., 2013) (**Figura 3**).

A realização do transplante de modo ortotópico proporciona o acondicionamento do enxerto em um ambiente mais próximo do seu natural, fornecendo assim, boas condições de temperatura, pressão, suprimento sanguíneo e estímulos moleculares. Esse método propiciou o restabelecimento da fertilidade em cerca de 95% das pacientes submetidas a este procedimento em um estudo realizado por Donnez & Dolmans (2017). Porém, esta técnica é muito invasiva,

necessitando de intervenção anestésica mais complexa, acesso a cavidade abdominal, aumentando os riscos ao paciente, no que diz respeito a infecções, principalmente em casos de retransplantes (KIM et al., 2014).

Figura 3 – Imagem ilustrativa dos tipos de transplante de tecido ovariano bovino de acordo com o local onde é realizado o enxerto.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Já o transplante de modo heterotópico apresenta menor risco ao paciente, pelo fato de ser um procedimento cirúrgico menos invasivo que pode ser realizado de forma mais rápida, com a utilização de anestésicos locais, possibilitando a inserção de múltiplos fragmentos e em períodos distintos, facilitando correções em casos de falha no enxerto (KIM et al., 2014).

2.3. Isquemia, hipóxia e angiogênese

Os tecidos ovarianos transplantados sofrem injúrias como, hipóxia (redução do aporte de oxigênio) e isquemia (falta de suprimento sanguíneo) desde a remoção do tecido do animal, até os primeiros dias após o transplante, ou seja, o transplante se configura como um processo danoso para o tecido ovariano (LEE et al., 2016). Desta forma, os primeiros sete dias após a realização do enxerto são cruciais para o sucesso do transplante, para a estabilização do número de folículos (VAN EYCK et al., 2009) e vascularização (ISRAELY et al., 2004).

Em resposta à redução de oxigênio e à isquemia, ocorre um recrutamento de novos vasos sanguíneos, a partir de vasos pré-existentes, em direção ao tecido ovariano (VAN EYCK et al., 2010), por meio de um organizado fluxo molecular, mediado por fatores pró-angiogênicos (CAO et al., 1998); este processo é denominado fisiologicamente de angiogênese. Nesta perspectiva, é fundamental a aplicação, utilização e aperfeiçoamento de técnicas para minimizar os efeitos negativos sofridos pelos enxertos ovarianos durante e após o transplante, favorecendo principalmente o restabelecimento da vascularização através da angiogênese (BUKOVSKY & CAUDLE, 2012), para que o transplante tenha bons resultados.

2.4. Aditivos para melhorar a sobrevivência do tecido ovariano no enxerto

Os PAFs possuem uma taxa metabólica relativamente baixa, podendo ser considerados como tolerantes a isquemia, além disso, são os primeiros a serem beneficiados pela neovascularização (AERTS; BOLS, 2010). No entanto, após o transplante ocorrem lesões isquêmicas extremas e perdas foliculares de cerca de 50% da população folicular (AERTS et al., 2008).

Com o intuito de aumentar a sobrevivência do tecido ovariano, diversas substâncias vêm sendo testadas, dentre estas, podemos citar: fibrina (SHIKANOV et al., 2011), colágeno (HENRY et al., 2015), matrigel (ZHANG et al., 2015), ácido hialurônico (TAVANA et al., 2016; OKTAY et al., 2016), hormônios como a eritropoietina (MAHMOODI et al., 2014), vitamina E (NUGENT et al., 1998), vitamina D e L-mesitan (AZEVEDO, 2019), L-carnitina (ZHANG et al., 2015), trolox (SCALERCIO et al., 2015), terapias celulares com células-tronco derivadas de tecido adiposo (ADSCs) (MANAVELLA et al., 2018; CACCIOTTOLA et al., 2020), fatores de crescimento, principalmente o VEGF (WANG et al., 2013; LANGBEEN et al., 2016; TAVANA et al., 2016; SHIKANOV et al., 2011; SKAZNIK-WIKIEL et al., 2011; HENRY et al., 2015; PINTO, 2020; SOUZA et al., 2020; AZEVEDO, 2019), fator de estimulação de colônia de granulócitos (SKAZNIK-WIKIEL et al., 2011) e fator de crescimento fibroblasto básico (bFGF) (WANG et al., 2013; TAVANA et al., 2016).

2.4.1. VEGF no transplante de tecido ovariano

O VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), ou seja, fator de crescimento endotelial vascular, vem desempenhando um papel fundamental na regulação dos processos angiogênicos, participando ativamente de vias de sinalização, através da modulação da proliferação e

migração de células endoteliais e a formação de novos vasos (SRINIVASAN et al., 2015). A atuação do VEGF é mediada por três receptores diferentes: o VEGFR-1 e VEGFR-2, expressos principalmente em células endoteliais vasculares e o VEGFR-3, expresso principalmente em células endoteliais linfáticas (MELINCOVICI et al., 2018).

O VEGF tem sido utilizado como um fator importante para a regulação do crescimento e maturação folicular, e para a manutenção das funções ovarianas (AZEVEDO, 2019). De acordo com Serrano et al. (2016), a seleção de folículos ovarianos em bovinos é influenciada pela expressão de VEGF, ou seja, os folículos não dominantes conservam uma maior concentração dos níveis de expressão do mRNA, tanto dos receptores de VEGF e seus receptores solúveis, como dos receptores de membrana, porém a dominância folicular está associada a uma diminuição da expressão de mRNA dos receptores solúveis, favorecendo o efeito biológico do VEGF, beneficiando o desenvolvimento folicular.

Quando se considera a biotécnica de TTO, o VEGF vem sendo utilizado de diferentes modos, como por exemplo: encapsulado junto a matriz, injetado no local de transplante ou adicionado no meio de incubação dos fragmentos ovarianos (SOUZA et al., 2020).

Diversos estudos estão sendo realizados com o intuito de avaliar o efeito do VEGF sobre enxertos de transplante ovariano. Mineur et al. (2007) relatam efeitos positivos do VEGF em transplante ovariano de ovelhas, assim como, em vacas (LANGBEEN et al., 2016), cadelas (COMMIN et al., 2012), mulheres (FRIEDMAN et al., 2012) e fêmeas de camundongos (SHIKANOV et al., 2011).

O VEGF, quando em associação com outros fatores angiogênicos como o bFGF, proporciona um aumento na taxa de PAFs e de vasos sanguíneos (LANGEBEEN et al., 2016), além de, promover o retorno do estro (GAO et al., 2015). Porém, outros estudos evidenciam que esta associação não afeta a expressão gênica de VEGF e densidade folicular (TAVANA et al., 2016). Com isso, mais estudos são necessários para a elucidação do efeito do VEGF no transplante de tecido ovariano, uma vez que, há controvérsias sobre o mesmo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Comitê de Ética

O procedimento experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará, sob protocolo de submissão nº #6520796/2015. O experimento foi conduzido na Universidade Estadual do Ceará, campus Itaperi, em Fortaleza-CE.

3.2. Animais

Foram utilizadas três vacas híbridas, com idade entre cinco a oito anos, sem raça definida, pertencentes à Fazenda de Experimentação Agropecuária Dr. Esaú Accioly Vasconcelos, Guaiúba da Universidade Estadual do Ceará. Os animais foram mantidos semi-confinados, a pasto em piquetes (forragem nativa e capim-mombaça) durante o dia e confinados durante a noite. Quanto a alimentação, os animais receberam suplementação com ração concentrada comercial balanceada, sal mineral e água *ad libitum*. Após o estudo, os animais foram alojados nas mesmas instalações e usados para pesquisa em estudos adicionais, pois as técnicas utilizadas não afetaram a atividade reprodutiva dos animais.

3.3. Coleta de tecido ovariano

Os fragmentos ovarianos foram obtidos pelo método de biópsia ovariana por pick-up (biopsy pick-up, BPU, Aerts et al. (2008)). Os animais receberam analgesia (flunixinina meglumina; Banamine®, 1,1 mg/kg, por via intravenosa (IV); Merck Animal Health, EUA), relaxamento retal (brometo de N-butil hioscina; Buscopan®, 0,2 mg/kg, por via IV; Boehringer Ingelheim; Alemanha) e sedação (xilazina; Sedomin®, 1 mg/kg, por via IV; König S.A, Argentina). O dispositivo BPU que foi usado é um instrumento automático com mola com um êmbolo na ponta de trocarte interno contendo um entalhe para recuperação do fragmento (15 mm × 1,6 mm) rodeado por uma agulha de corte externo de calibre 16 (US Biopsy, Franklin, EUA). O dispositivo foi introduzido através de uma guia de agulha montada em uma sonda para transdutor de matriz convexa guiada por ultrassom transvaginal de 10 MHz (Honda HCV-3710MV), que foi usado para a colocação da agulha de biópsia dentro do ovário.

3.4. Manuseio do tecido ovariano

Logo após o procedimento de BPU, os fragmentos de biópsia (n = 6 fragmentos puncionados por animal, oriundos de três animais, sendo 18 ao todo) foram lavados e mantidos em meio α -MEM suplementado com 1,25 mg/mL de albumina de soro bovino (BSA), 100 mg/L de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina, 0,047 mM de piruvato de sódio e 2,5 mM de HEPES. Todos estes produtos foram obtidos da empresa Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA).

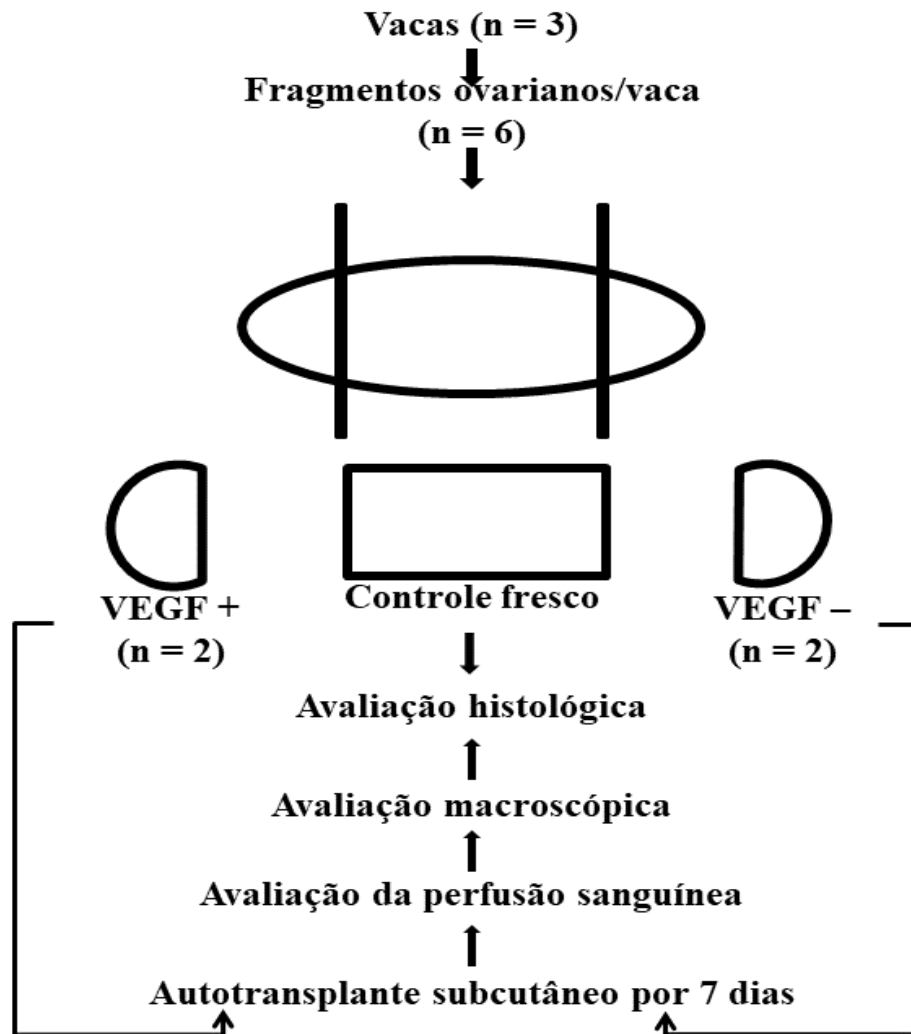
3.5. Design experimental

Neste estudo, os fragmentos de biópsia ovariana (2 x 2 x 12 mm, Haag et al., 2013) de cada animal (replicata) foram coletados e distribuídos aleatoriamente em três grupos tratados descritos a seguir: (1) Controle fresco (n = 2 por animal, 6 ao todo), fragmentos imediatamente fixados para avaliação histológica; (2) Transplante fresco VEGF + (n = 2 por animal, 6 ao todo), os fragmentos foram incubados em temperatura ambiente de 25°C por 30 minutos em meio α -MEM suplementado com 50 ng/mL VEGF (V7259; Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) e então imediatamente autotransplantados por um período de sete dias; (3) Transplante fresco VEGF- (n = 2 por animal, 6 ao todo), os fragmentos foram incubados em temperatura ambiente de 25°C por 30 minutos em meio α -MEM sem adição de VEGF e então imediatamente autotransplantados por um período de sete dias (**Figura 4**).

3.6. Autotransplante de fragmentos ovarianos

Para o procedimento cirúrgico de transplante dos fragmentos ovarianos, as vacas foram sedadas (xilazina; Sedomin, 1 mg / kg, IV; König S.A, Argentina) e anestesiadas localmente (cloridrato de lidocaína, 10 mg/kg, subcutâneo (SC)). Em seguida, uma única incisão (~ 4 cm) foi feita na pele, na região do flanco nas três vacas para enxertar os fragmentos ovarianos no tecido subcutâneo. Os fragmentos ovarianos foram autotransplantados e suturados com náilon 6/0 não absorvível. Os fragmentos incubados em VEGF foram inseridos na borda caudal da incisão, enquanto os fragmentos incubados sem VEGF foram transplantados na região da borda cranial da incisão.

Figura 4 – Desenho experimental.



Fonte: Elaborada pelo autor.

3.7. Avaliação da perfusão sanguínea

Após o procedimento de enxerto ovariano, foi avaliada a perfusão do fluxo sanguíneo perto dos fragmentos enxertados, pela ultrassonografia Doppler em cores. Os vídeos ultrassonográficos foram obtidos em seis regiões (R) sendo elas: região dorsal ao autotransplante (R1), região cranial ao autotransplante (R2), região ventral ao autotransplante (R3), região caudal ao autotransplante (R4), região do autotransplante VEGF+ (R5) e região do autotransplante VEGF- (R6). Contudo, para efeito de comparação estatística, foram considerados somente o fluxo sanguíneo das áreas R5 e R6. Os exames foram realizados a cada 48 horas por um período de sete dias. Foi utilizada uma máquina de ultrassom Doppler colorido

duplex portátil (CTS-8800V, SIUI, Jiangsu, China) conectado a uma sonda microconvexa (6,5 MHz).

3.8. Recuperação dos enxertos e avaliação macroscópica

Após sete dias os animais receberam anestesia (de modo similar ao protocolo descrito para o transplante) para a realização da recuperação dos enxertos. Durante a recuperação dos enxertos, estes foram avaliados macroscopicamente por um único operador usando um sistema de pontuação semiquantitativo (SOUZA et al., 2020). Os critérios, bem como o sistema de pontuação utilizado durante a avaliação macroscópica dos enxertos estão descritos na **(Tabela 1)**.

Tabela 1 – Sistema semiquantitativo para a classificação macroscópica dos fragmentos ovarianos após autotransplante subcutâneo.

Parâmetros	Pontuação				
	1	2	3	4	5
A- Morfologia	Necrótico	Alguns pontos de necrose	Intacto e semelhante ao enxerto original	Intacto e ligeiramente inchado	Intacto e inchado com aumento de volume
B- Adesão do enxerto ao tecido hospedeiro	Pobre	Ligeiramente inserido	Moderadamente inserido	Forte	Intenso
C- Extensão do sangramento no momento da remoção do enxerto	Sangramento ausente	Em até duas áreas ao redor do fragmento	Na metade do fragmento	Em dois terços do fragmento	Em todo o fragmento

Legenda: a. morfologia: 1 = necrótico (enxerto totalmente escuro), 2 = alguns pontos de necrose, 3 = intacto e semelhante ao enxerto original, 4 = intacto e ligeiramente inchado e 5 = intacto e inchado com aumento de volume; b. adesão do enxerto ao tecido hospedeiro: 1 = pobre (fácil de remover), 2 = ligeiramente inserido, 3 = moderadamente inserido, 4 = forte (bem inserido, com alguma dificuldade para remoção), e 5 = intenso (muito difícil de remover); c. Extensão do sangramento no momento da remoção do enxerto: 1 = sangramento ausente, 2 = em até duas áreas ao redor do fragmento, 3 = na metade do fragmento, 4 = em dois terços do fragmento e 5 = em torno de todo o fragmento.

Fonte: Souza et al. (2020)

3.9. Preparação do material para a avaliação histológica

Após a avaliação macroscópica, os enxertos teciduais foram colocados individualmente em uma placa de Petri contendo a-MEM e HEPES para lavagem, passando por tubo Eppendorf para fixação. Todas as amostras foram fixadas em paraformaldeído (4%) por duas horas, logo após foram desidratadas em solução de álcool 70%. Após a preparação histológica padrão, as amostras foram cortadas em secções seriais de 7 μm (ALVES et al., 2015). Cada secção foi montada e corada com Ácido Periódico-Schiff (PAS) e contrastada com hematoxilina.

3.10. Avaliação histológica

Para avaliação histológica dos folículos, os cortes histológicos foram analisados em microscopia de luz (Nikon E200; Tóquio, Japão) com aumento de 400 \times . Os folículos foram classificados morfológicamente como: normais (quando apresentaram um oócito intacto e células da granulosa intactas distribuídas de forma organizada) e anormais ou degenerados (retração plasmática, picnose nuclear e desagregação entre células da granulosa e oócito, com desorganização da arquitetura folicular), conforme Carvalho et al. (2014).

Os folículos também foram classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento em primordial, ou em folículos em desenvolvimento (transição, primário e secundário), segundo Hulshof et al. (1994). Todas as secções histológicas foram examinadas pelo mesmo examinador, o qual não sabia a identidade e o tratamento ao qual cada lâmina pertencia. Com o intuito de evitar a contagem dupla dos folículos entre as secções histológicas, só foram analisados os folículos PAFs contendo oócitos com núcleo visível evitando-se a repetição de leitura entre os segmentos histológicos.

3.11. Análise estatística

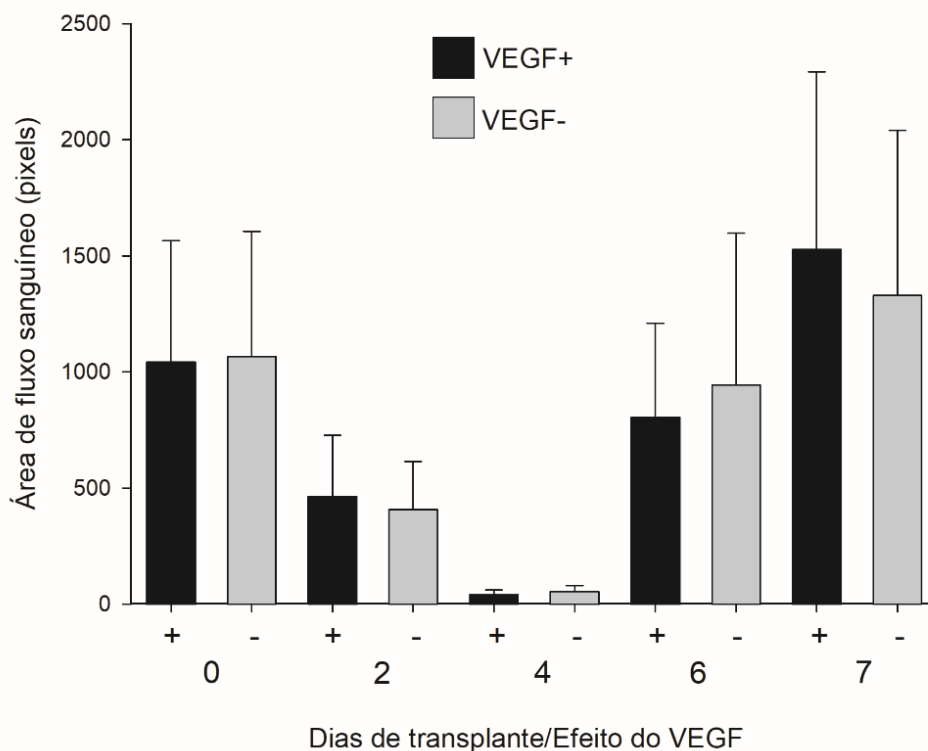
Os dados foram avaliados quanto a sua normalidade utilizando o software Sigmaplot versão 11.0 (San Jose, CA, Estados Unidos). A avaliação da morfologia folicular foi realizada por meio de teste qui-quadrado. Os demais parâmetros foram comparados utilizando-se ANOVA em dados ranqueados seguidos de teste Mann-Whitney. Após análise, os resultados foram descritos em porcentagem (morfologia folicular) ou média \pm erro padrão da média (demais parâmetros). Os dados foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação da área de fluxo sanguíneo

Em geral, o fluxo sanguíneo não apresentou diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos, bem como entre os dias avaliados (**Figura 5**). Estes resultados estão de acordo com relatos prévios de Pinto et al, (2020), que ao avaliar e validar a utilização da ultrassonografia por modo Doppler, não encontrou diferença na avaliação do fluxo sanguíneo de enxertos ovarianos caprino em autotransplante heterotópico.

Figura 5 – Área de fluxo sanguíneo (em pixels) das regiões em cada sítio de transplante heterotópico (R5, VEGF+ e R6, VEGF-) em fragmentos expostos (+) ou não (-) ao fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) ao longo dos dias pós-transplante.



Legenda: + (fragmentos transplantados expostos ao VEGF (50ng/mL)); - (fragmentos não expostos ao VEGF). Regiões avaliadas: (R5) região do autotransplante VEGF+ e (R6) região do autotransplante VEGF-. Dias de avaliação pós-transplante (0, 2, 4, 6 e 7). Não houve diferença ($P > 0,05$) entre os dias de transplante entre tratamentos e entre tratamentos dentro do mesmo dia de transplante.

4.2. Avaliação macroscópica

Os aspectos macroscópicos dos fragmentos ovarianos recuperados após autotransplante subcutâneo por sete dias, não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) nos parâmetros de morfologia, adesão do enxerto ao tecido hospedeiro e extensão do sangramento no momento do enxerto, quando comparado entre os fragmentos pertencentes ao grupo controle fresco em relação aos fragmentos dos grupos VEGF + e VEGF - (**Tabela 2**).

Corroborando com os resultados apresentados por Souza et al. (2020) onde também não foi observado diferença significativa na avaliação macroscópica de fragmentos ovarianos de éguas após autotransplante. Nesta mesma perspectiva Pinto et al. (2020) ao comparar a implantação de fragmentos ovarianos de cabras em sítios IM e SC, também não observaram diferença significativa entre os grupos em relação a morfologia e a adesão do enxerto, no entanto, observaram diferença significativa quanto a hemorragia, sendo que a maior pontuação foi observada nos fragmentos recuperados do sítio IM. Fato este que pode ser explicado devido a intensa vascularização presente na musculatura (DATH et al., 2010).

Tabela 2 – Valores médios (X), desvio padrão (s), erro padrão da média (EPM) e variância (V) da avaliação macroscópica de fragmentos ovarianos bovino com e sem VEGF, após autotransplante subcutâneo por sete dias.

	Parâmetros de avaliação					
	Morfologia		Adesão		Hemorragia	
	VEGF +	VEGF -	VEGF +	VEGF -	VEGF +	VEGF -
Média	4,3	2,3	5,0	5,0	2,3	2,7
Desvio padrão	0,6	1,0	0,0	0,0	1,5	0,6
Erro padrão da média	0,2	0,4	0,0	0,0	0,5	0,2
Variância	2.0 – 5.0	1.0 – 5.0	2.0 – 5.0	2.0 – 5.0	1.0 – 5.0	2.0 – 5.0

Legenda: Fragmentos de tecido ovariano bovino foram destinados para os grupos controle fresco (controle), ou transplantados para bovinos ($n = 3$) em sítio subcutâneo (flanco) com ou sem a incubação prévia com o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF; VEGF + ou VEGF -), respectivamente. Não houve diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos.

Fonte: O autor, adaptado de UECE (2021).

4.3. Avaliação dos cortes histológicos

Nos 3.981 cortes histológicos analisados provenientes das 18 amostras de biópsia (seis fragmentos por animal x três vacas), foi encontrado um total de 623 folículos pré-antrais. A distribuição do número de folículos pré-antrais normais e anormais entre os animais e os tratamentos está descrita na **(Tabela 3)**.

Tabela 3 – Distribuição do número de folículos pré-antrais normais e anormais por categoria folicular entre os animais e entre os tratamentos.

Replicatas	Grupos experimentais	Número de folículos pré-antrais							
		Primordiais		Transicionais		Primários		Total	
		Normais	Anormais	Normais	Anormais	Normais	Anormais	Normais	Anormais
Animal 1	Controle	21	22	0	0	0	2	24	21
	VEGF +	9	31	4	3	2	1	15	35
	VEGF -	38	15	3	3	0	0	41	18
Animal 2	Controle	11	4	4	0	0	1	15	5
	VEGF +	0	5	0	1	0	0	0	6
	VEGF -	2	2	1	3	0	0	3	5
Animal 3	Controle	249	51	49	8	7	2	305	61
	VEGF +	3	23	1	10	0	0	4	33
	VEGF -	5	23	1	2	0	1	6	26
Total		338	176	63	30	9	7	413	210

Legenda: Fragmentos de tecido ovariano bovino foram destinados para os grupos controle fresco (controle), ou transplantados para bovinos (n = 3) em sítio subcutâneo (flanco) com ou sem a incubação prévia com o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF; VEGF + ou VEGF -), respectivamente.

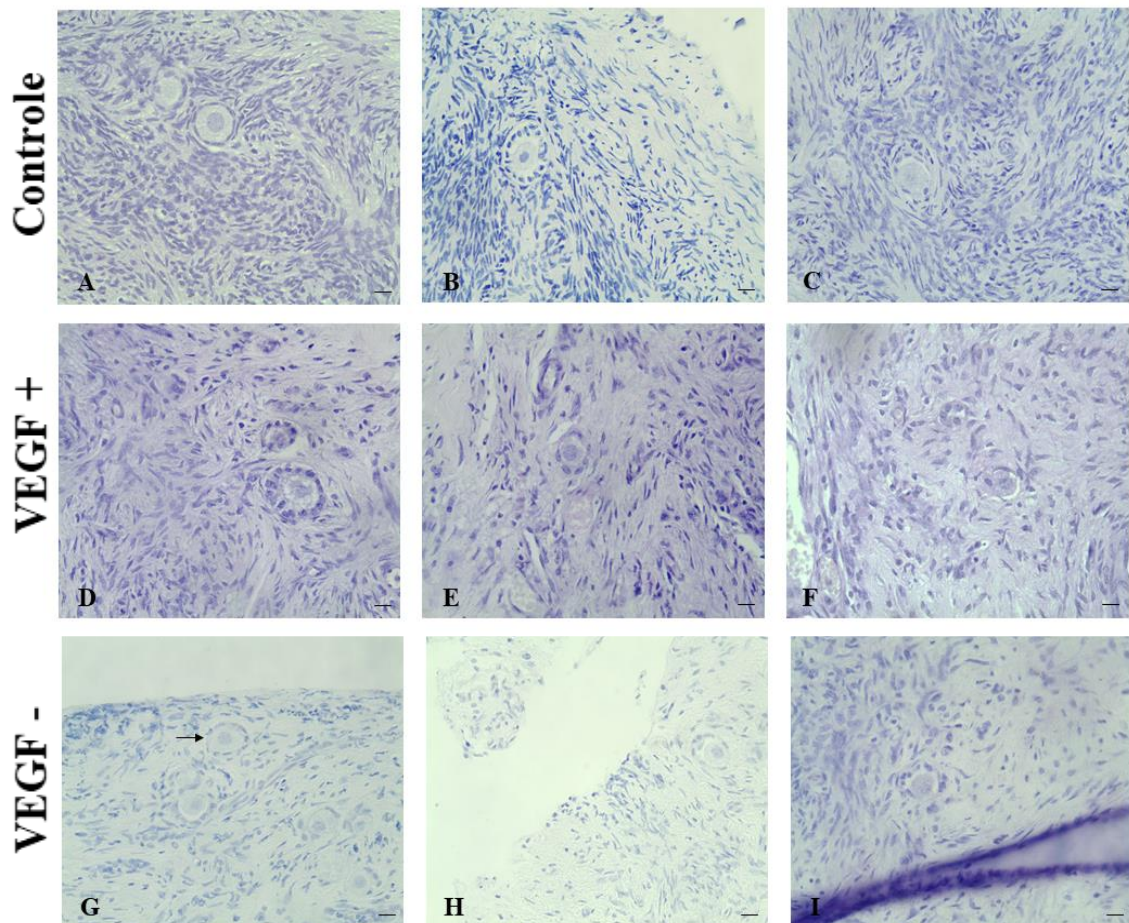
Fonte: O autor, UECE (2021).

Dos folículos encontrados, 431 pertenciam ao grupo controle; 93 folículos pertenciam ao grupo transplante VEGF + e 99 ao grupo transplante VEGF -. A depleção folicular observada quando comparamos o número total de folículos do grupo controle, em relação aos grupos transplante (VEGF + e VEGF -) é esperada, pelo o fato do tecido transplantado sofrer danos supostamente provocados pela recuperação de tecido ovariano do doador (BARBERINO et al., 2016), procedimento cirúrgico de transplante e enxerto (CAMPBELL et al., 2014) e suprimento vascular inadequado (MA et al., 2017), levando a quadros de hipóxia e dano isquêmico ao tecido enxertado, culminando em perda folicular.

Considerando o número de folículos por animal, no animal 1 foram encontrados 154 folículos; no animal 2, 34 folículos e no animal 3 foram encontrados 435 folículos. Neste caso podemos observar que houve uma diferença quanto ao número total de folículos entres os animais. Fato este que pode ser explicado pela a heterogeneidade da amostra.

Na figura abaixo (**Figura 6**) estão representados morfologicamente os folículos pré-antrais e suas respectivas categorias nos diferentes tratamentos.

Figura 6 – Imagens morfológicas de folículos pré-antrais de tecido ovariano bovino autotransplantado subcutâneamente.



Legenda: Fragmentos de tecido ovariano bovino foram destinados para os grupos controle fresco (controle), ou transplantados para bovinos ($n = 3$) em sítio subcutâneo (flanco) com ou sem a incubação prévia por 30 minutos com o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF; VEGF + ou VEGF -), respectivamente. A, E e G (seta), folículos primordiais normais; C, F e H folículos primordiais anormais; (I) folículo transicional anormal e (B e D) folículos primários normais. Ampliação: 400 x. Barras: 20 μm .

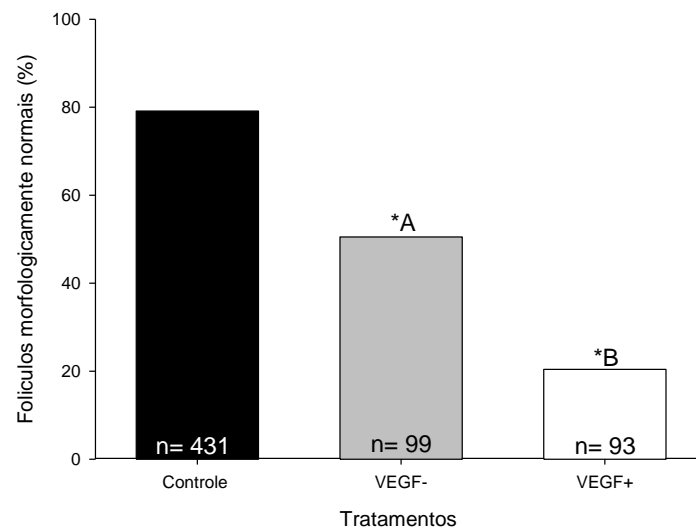
Fonte: O autor, UECE (2021).

4.3.1. Folículos morfologicamente normais

Os resultados quanto ao percentual de folículos considerados morfologicamente normais nos fragmentos de tecido ovariano fresco (controle), bem como nos fragmentos autotransplantados heterotopicamente com e sem a presença de VEGF demonstraram que ambos os grupos transplantados (VEGF + e VEGF-) foram significativamente inferiores

quando comparados com o grupo controle fresco (**Figura 7**). Conforme relatado por Souza et al. (2020) em experimento realizando em éguas autotransplantadas heterotopicamente (pescoço), não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre o grupo controle e os grupos transplantados quanto ao percentual de folículos pré-antrais normais.

Figura 7 – Percentual (%) de folículos pré-antrais morfologicamente normais após autotransplante heterotópico de tecido ovariano bovino.



Legenda: Fragmentos de tecido ovariano bovino foram destinados para os grupos controle fresco (controle), ou transplantados para bovinos ($n = 3$) em sítio subcutâneo (flanco) com ou sem a incubação prévia com o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF; VEGF + ou VEGF -), respectivamente. * Indica diferença ($P < 0,05$) entre os tratamentos quando comparado com o grupo controle fresco. ^{A B} Indica diferença ($P < 0,05$) entre os grupos transplantados. n = número total de folículos lidos em cada tratamento.

Fonte: O autor, UECE (2021).

Quando comparados entre tratamentos transplantados, o grupo VEGF - apresentou um percentual de folículos normais significativamente superior ($P < 0,05$) quando comparado com o grupo VEGF +. Relatos prévios (PINTO, 2020) demonstraram uma diferença significativa ($P < 0,05$) na porcentagem de folículos pré-antrais normais entre os grupos resfriamento e autotransplante com VEGF e resfriamento e autotransplante sem VEGF, onde o grupo com VEGF teve uma maior porcentagem de normais em relação ao grupo sem o VEGF, diferindo do encontrado no presente trabalho. Desta forma, o VEGF parece ser mais importante como um fator de sobrevivência em tecido ovariano submetido a manipulação mais adicional, do que quando em tecido fresco.

O VEGF é uma substância que possui propriedades angiogênicas, que em teoria seriam benéficas para o processo de formação de novos vasos e, conseqüentemente, de diminuição do

processo de isquemia/reperfusão característicos do procedimento de transplante. No entanto, o grupo suplementado com VEGF não teve um resultado benéfico sobre os folículos morfologicamente normais. Isso em parte pode ser explicado pelo aumento da expressão de substâncias como citocinas, fatores pró-inflamatórios e radicais livres (BLUMENFELD, 2018; GELLERT et al., 2018); agentes estressores e estresse oxidativo (NIKOLETOPOULOU et al., 2013) pós-transplante. O aumento na liberação destas substâncias ocorre em resposta aos danos causados pela hipóxia e a isquemia tecidual, que conseqüentemente levam os folículos a apoptose após o transplante.

Segundo Fransolet et al. (2015) a influência exercida pelo VEGF, na formação de novos vasos sanguíneos em TTO tem intensidade diferente de acordo com a linhagem animal, sugerindo que a ação do VEGF pode ser espécie-específica. Adicionalmente, Araújo et al. (2011) demonstrou que o VEGF possui um efeito concentração dependente, sobre folículos secundários isolados cultivados, sugerindo um papel concentração dependente deste fator de crescimento.

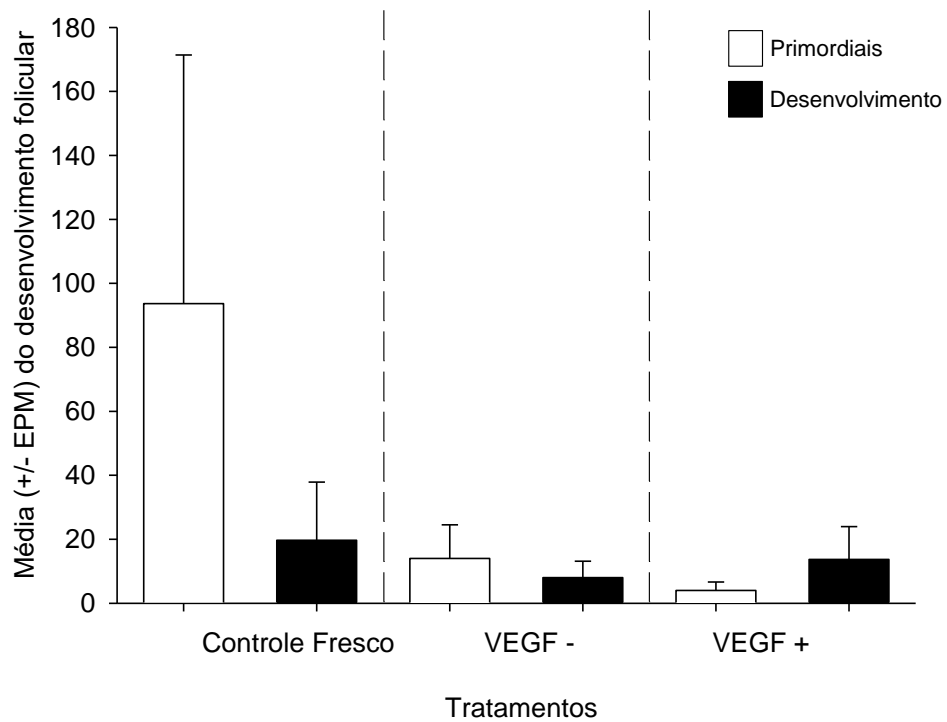
4.3.2. Folículos em desenvolvimento

Quanto ao desenvolvimento folicular, considerando apenas os folículos normais, não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos relacionando a média (\pm erro padrão da média) dos folículos primordiais com a média (\pm erro padrão da média) dos folículos em desenvolvimento (**Figura 8**).

Há não observação de um número maior de folículos em desenvolvimento em relação aos folículos primordiais, pode ser explicada pelo fato dos folículos primordiais terem uma taxa de metabolização menor sendo considerados como mais resistentes em relação aos folículos em desenvolvimento, sendo assim grande parte dos folículos em desenvolvimento, por terem uma taxa de metabolização mais elevada, não resistiram e degeneraram, quando expostos a fatores estressantes e condições danosas.

O desenvolvimento folicular pode ser influenciado pelas condições estressantes e danosas ao tecido durante o procedimento de transplante (LEE et al., 2016). Além disso fatores como: temperatura e tempo de transporte, bem como temperatura e tempo de incubação devem ser considerados. O tamanho do fragmento e meio de incubação também podem contribuir para o sucesso do desenvolvimento folicular (BARBERINO et al., 2019).

Figura 8 – Média (\pm erro padrão da média, EPM) do desenvolvimento folicular de folículos morfologicamente normais após autotransplante heterotópico de tecido ovariano bovino.



Legenda: Fragmentos de tecido ovariano bovino foram destinados para os grupos controle fresco (controle), ou transplantados para bovinos ($n = 3$) em sítio subcutâneo (flanco) com ou sem a incubação prévia com o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF; VEGF + ou VEGF -), respectivamente. Não houve diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos observados dentro das categorias entre tratamentos e dentro do tratamento entre categorias.
 Fonte: O autor, UECE (2021).

5. CONCLUSÃO

O VEGF não apresentou efeitos benéficos sobre o tecido ovariano bovino submetido ao autotransplante subcutâneo num período de sete dias. Os resultados apresentados são relativos a uma amostra de três animais e devem ser interpretados cautelosamente. A avaliação da análise das demais amostras do experimento poderá esclarecer os resultados encontrados, afim de comprovar-se ou não a eficácia do VEGF. Ajustes na concentração do VEGF, bem como seu tempo de exposição nos tecidos ovarianos submetidos a manipulação biotecnológica adicional (por exemplo, criopreservação) constituem-se de grande interesse de investigação. Finalmente, o efeito do VEGF sobre tecidos transplantados por períodos de tempo maiores (dados ainda não testados), implicará em maior desafio tecidual, podendo ser benéfico para a produção de sobrevivência tecidual.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AERTS, J. et al. Quantification and viability assessment of isolated bovine primordial and primary ovarian follicles retrieved through a standardized biopsy pick-up procedure.

Reproduction in Domestic Animals, v. 43, n.3, p. 360-366, 2008.

AERTS, J. M. J.; BOLS, P. E. J. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. **Reproduction in domestic animals**, v. 45, n. 1, p. 171-179, 2010.

ALVES, K. A. et al. Number and density of equine preantral follicles in different ovarian histological section thicknesses. **Theriogenology**, v. 83, n. 6, p. 1048-1055, 2015.

ARAÚJO, V. R. et al. Vascular endothelial growth factor-A 165 (VEGF-A 165) stimulates the *in vitro* development and oocyte competence of goat preantral follicles. **Cell and tissue research**, v. 346, n. 2, p. 273-281, 2011.

ARAÚJO, V. R. et al. *In vitro* culture of bovinepreantral follicles. **Reproductive biology and endocrinology**, v. 12, n. 1, p. 1-14, 2014.

AZEVEDO, A. R. F. **Xenotransplante de tecido ovárico bovino como modelo para testar novas drogas, analisar a angiogénese, a depleção prematura e a dinâmica folicular.**

Dissertação (Mestrado em Investigação Biomédica). Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, p. 130, 2019.

BARBERINO, R. S. et al. Influence of the ovarian fragmentation before storage at 4o C on the apoptosis rates and *in vitro* development of ovine preantral follicles. **Animal Reproduction**, v. 13, n. 1, p. 28-35, 2016.

BARBERINO, R. S. et al. Transport of domestic and wild animal ovaries: A review of the effects of medium, temperature, and periods of storage on follicular viability.

Biopreservation and Biobanking, v. 17, n. 1, p. 84–90, 2019.

BLUMENFELD, Z. Ovarian tissue transplantation and leukemia. **Fertility and sterility**, v. 109, n. 1, p. 69-70, 2018.

BUKOVSKY, A; CAUDLE, M. R. Immunoregulation of follicular renewal, selection, POF, and menopause *in vivo*, vs. neo-oogenesis *in vitro*, POF and ovarian infertility treatment, and a clinical trial. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 10, n. 1, p. 1-45, 2012.

CACCIOTTOLA, L. et al. Adipose tissue–derived stem cells protect the primordial follicle pool from both direct follicle death and abnormal activation after ovarian tissue transplantation. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 38, n. 1, p. 151-161, 2020.

CAMPBELL, B. K. et al. Restoration of ovarian function and natural fertility following the cryopreservation and autotransplantation of whole adult sheep ovaries. **Human reproduction**, v. 29, n. 8, p. 1749-1763, 2014.

CAMPOS-JUNIOR, P. H. A. et al. Ovarian grafts 10 days after xenotransplantation: folliculogenesis and recovery of viable oocytes. **PloS one**, v. 11, n. 6, p. 1-4, 2016.

CAO, Y. et al. Vascular endothelial growth factor C induces angiogenesis in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 24, p. 14389-14394, 1998.

CARVALHO, A. A. et al. Catalase addition to vitrification solutions maintains goat ovarian preantral follicles stability. **Research in veterinary science**, v. 97, n. 1, p. 140-147, 2014.

COMMIN, L. et al. Follicle development in cryopreserved bitch ovarian tissue grafted to immunodeficient mouse. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 3, p. 461-471, 2012.

DATH, C. et al. Xenotransplantation of human ovarian tissue to nude mice: comparison between four grafting sites. **Human reproduction**, v. 25, n. 7, p. 1734-1743, 2010.

DONFACK, N. J. **Auto e xenotransplante para restauração da função ovariana após vitrificação de tecido ovariano caprino**. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias, Fortaleza, p. 183, 2017.

DONNEZ, J. et al. Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation. **Fertility and Sterility**, v. 99, n. 6, p. 1503-1513, 2013.

DONNEZ, J; DOLMANS, M. M. Fertility preservation in women. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 17, p. 1657-1665, 2017.

DOS SANTOS, J. T. et al. Efeito do tipo de fixador e tempo de fixação na morfologia de folículos pré-antrais ovarianos bovinos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 1, p. 297-303, 2012.

ERICKSON, G. F. An analysis of follicle development and ovum maturation. In: **Seminars in reproductive endocrinology**, v. 4, n. 3, p. 233-254, 1986.

FRANSOLET, M. et al. Influence of mouse strain on ovarian tissue recovery after engraftment with angiogenic factor. **Journal of ovarian research**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2015.

FRIEDMAN, O. R. et al. Possible improvements in human ovarian grafting by various host and graft treatments. **Human Reproduction**, v. 27, n. 2, p. 474-482, 2012.

GAO, J. et al. Effect of local basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor on subcutaneously allotransplanted ovarian tissue in ovariectomized mice. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0134035, 2015.

GELLERT, S. E. et al. Transplantation of frozen-thawed ovarian tissue: an update on worldwide activity published in peer-reviewed papers and on the Danish cohort. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 35, n. 4, p. 561-570, 2018.

- HAAG, K. T. et al. Equine preantral follicles obtained via the Biopsy Pick-Up method: histological evaluation and validation of a mechanical isolation technique. **Theriogenology**, v. 79, n. 5, p. 735-743, 2013.
- HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 7.ed. São Paulo: Manole, p. 513, 2004.
- HENRY, L. et al. Isoform 165 of vascular endothelial growth factor in collagen matrix improves ovine cryopreserved ovarian tissue revascularisation after xenotransplantation in mice. **Reproductive biology and endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 1-10, 2015.
- HULSHOF, S.C.J. et al. Isolation and Characterization of preantral follicles from fetal bovine ovaries. **Vet Quart**, v.2, n.16, p.78-80, 1994.
- ISRAELY, T. et al. Angiogenesis in ectopic ovarian xenotransplantation: Multiparameter characterization of the neovasculature by dynamic contrast-enhanced MRI. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 52, n. 4, p. 741-750, 2004.
- KIM, S. S. Revisiting the role of heterotopic ovarian transplantation: futility or fertility. **Reproductive biomedicine online**, v. 28, n. 2, p. 141-145, 2014.
- LEE, J. et al. Ovarian injury during cryopreservation and transplantation in mice: a comparative study between cryoinjury and ischemic injury. **Human reproduction**, v. 31, n. 8, p. 1827-1837, 2016.
- LANGBEEN, A. et al. Morphometrical analysis of preantral follicular survival of VEGF-treated bovine ovarian cortex tissue following xenotransplantation in an immune deficient mouse model. **Animal reproduction science**, v. 168, p. 73-85, 2016.
- MA, W. Z. et al. Optimal FSH usage in revascularization of allotransplanted ovarian tissue in mice. **Journal of ovarian research**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2017.
- MANAVELLA, D. D. et al. Two-step transplantation with adipose tissue-derived stem cells increases follicle survival by enhancing vascularization in xenografted frozen-thawed human ovarian tissue. **Human Reproduction**, v. 33, n. 6, p. 1107-1116, 2018.
- MAHMOODI, M. et al. Effects of erythropoietin on ischemia, follicular survival, and ovarian function in ovarian grafts. **Reproduction**, v. 147, n. 5, p. 733-741, 2014.
- MELINCOVICI, C. S. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-key factor in normal and pathological angiogenesis. **Rom J Morphol Embryol**, v. 59, n. 2, p. 455-467, 2018.
- MINEUR, P. et al. Newly identified biologically active and proteolysis-resistant VEGF-A isoform VEGF111 is induced by genotoxic agents. **The Journal of cell biology**, v. 179, n. 6, p. 1261-1273, 2007.
- NIKOLETOPOULOU, V. et al. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1833, n. 12, p. 3448-3459, 2013.

- NUGENT, D. et al. Protective effect of vitamin E on ischaemia-reperfusion injury in ovarian grafts. **Reproduction**, v. 114, n. 2, p. 341-346, 1998.
- NUTTINCK, F. et al. Characterization of in vitro growth of bovine preantral ovarian follicles: a preliminary study. **Theriogenology**, v. 39, p. 811-821, 1993.
- OKTAY, K. et al. First pregnancies, live birth, and in vitro fertilization outcomes after transplantation of frozen-banked ovarian tissue with a human extracellular matrix scaffold using robot-assisted minimally invasive surgery. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 214, n. 1, p. 94. e1-94. e9, 2016.
- ORTEGA SERRANO, P. V. et al. Reduction in the mRNA expression of sVEGFR 1 and sVEGFR 2 is associated with the selection of dominant follicle in cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, n. 6, p. 985-991, 2016.
- PINTO, Y. **Parâmetros morfofuncionais do tecido ovariano submetido ao transplante heterotópico**. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Abaiara, p. 146, 2020.
- PINTO, Y. et al. Heterotopic ovarian allotransplantation in goats: Preantral follicle viability and tissue remodeling. **Animal reproduction science**, v. 215, p. 106310, 2020.
- SCALERCIO, R. et al. Trolox enhances follicular survival after ovarian tissue autograft in squirrel monkey (*Saimiri collinsi*). **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 11, p. 1854-1864, 2015.
- SILBER, S. J. Ovary cryopreservation and transplantation for fertility preservation. **Molecular human reproduction**, v. 18, n. 2, p. 59-67, 2012.
- SHIKANOV, A. et al. Fibrin encapsulation and vascular endothelial growth factor delivery promotes ovarian graft survival in mice. **Tissue engineering part A**, v. 17, n. 23-24, p. 3095-3104, 2011.
- SKAZNIK-WIKIEL, M. E. et al. Granulocyte colony-stimulating factor in conjunction with vascular endothelial growth factor maintains primordial follicle numbers in transplanted mouse ovaries. **Fertility and sterility**, v. 95, n. 4, p. 1405-1409, 2011.
- SOUZA, S. S. **Efeito do resfriamento, criopreservação e exposição ao fator de crescimento endotelial vascular sobre o tecido ovariano equino auto ou xenotransplantado**. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Fortaleza, p. 157, 2020.
- SOUZA, S. S. et al. Heterotopic autotransplantation of ovarian tissue in a large animal model: Effects of cooling and VEGF. **PloS one**, v. 15, n. 11, p. e0241442, 2020.
- SRINIVASAN, S. et al. Hypoxia-induced expression of phosphocyanin-like 3 regulates expression of VEGFR-2 and promotes angiogenesis. **Angiogenesis**, v. 18, n. 4, p. 449-462, 2015.

SUH, C. S; SONNTAG, B; ERICKSON, G, F. The ovarian life cycle: a contemporary view. **Reviews in endocrine & metabolic disorders**, v. 3, n. 1, p. 5-12, 2002.

TAHAEI, L. S. et al. Follicle development of xenotransplanted sheep ovarian tissue into male and female immunodeficient rats. **International journal of fertility & sterility**, v. 9, n. 3, p. 354-360, 2015.

TAVANA, S. et al. Restoration of ovarian tissue function and estrous cycle in rat after autotransplantation using hyaluronic acid hydrogel scaffold containing VEGF and bFGF. **Growth Factors**, v. 34, n. 3-4, p. 97-106, 2016.

VAN EYCK, A. S. et al. Electron paramagnetic resonance as a tool to evaluate human ovarian tissue reoxygenation after xenografting. **Fertility and sterility**, v. 92, n. 1, p. 374-381, 2009.

VAN EYCK, A. S. et al. Both host and graft vessels contribute to revascularization of xenografted human ovarian tissue in a murine model. **Fertility and sterility**, v. 93, n. 5, p. 1676-1685, 2010.

WANDJI, S. A. et al. Initiation in vitro of growth of bovine primordial follicles. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 5, p. 942-948, 1996.

WANG, L. et al. VEGF and bFGF increase survival of xenografted human ovarian tissue in an experimental rabbit model. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 30, n. 10, p. 1301-1311, 2013.

ZHANG, Q. et al. Effects of L-carnitine on follicular survival and graft function following autotransplantation of cryopreserved-thawed ovarian tissues. **Cryobiology**, v. 71, n. 1, p. 135-140, 2015.